

(19) RÉPUBLIQUE FRANÇAISE
 INSTITUT NATIONAL
 DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE
 PARIS

(11) N° de publication : **2 529 892**
 (à n'utiliser que pour les
 commandes de reproduction)
 (21) N° d'enregistrement national : **82 12100**
 (51) Int Cl³ : C 07 F 7/10; C 07 H 21/00.

(12) **DEMANDE DE BREVET D'INVENTION**

A1

(22) Date de dépôt : 9 juillet 1982.

(30) Priorité

(43) Date de la mise à disposition du public de la
 demande : BOPI « Brevets » n° 2 du 13 janvier 1984.

(60) Références à d'autres documents nationaux appa-
 rentés :

(71) Demandeur(s) : *TRANSGENE SA* — FR.

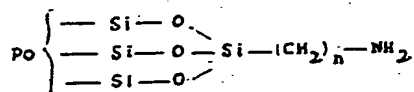
(72) Inventeur(s) : Vipin Kohli, Alain Balland et Jean-Pierre
 Lecocq.

(73) Titulaire(s) :

(74) Mandataire(s) : Regimbeau, Corre, Martin et Schrimpf.

(54) Nouveau support pour la synthèse des polynucléotides, en particulier par la méthode triester et procédé pour sa
 préparation.

(57) La présente invention concerne, à titre de support dans la
 synthèse des polynucléotides par la méthode triester, une silice
 HPLC modifiée pour porter les groupements de formule :



Po schématisant le support HPLC et *n* ayant une valeur de 1 à
 100.

FR 2 529 892 - A1

coupure chimique et finalement purifié par les techniques chromatographiques après avoir éliminé les différents groupes protecteurs.

5 Il existe de nombreux procédés de synthèse en phase solide pour la synthèse des oligonucléotides. Traditionnellement, le problème le plus important dans le cadre des procédés utilisant un support tient à la nature même du support. De nombreux polymères ont été
10 utilisés dans ce type de synthèse et se sont tous révélés insuffisants pour différentes raisons. En particulier, les nucléotides activés diffusent très lentement à l'intérieur de tels supports et il se produit une absorption irréversible de certains réactifs sur le polymère ; enfin, les polymères organiques ont tendance
15 à gonfler de façon excessive.

Bien entendu tous ces problèmes pourraient être écartés en utilisant un support inorganique. Sur un tel support, les solvants et les réactifs peuvent être aisément éliminés et bien entendu il s'agit d'un
20 support qui ne gonfle pas.

Un tel support a déjà été proposé pour la synthèse des déoxypolynucléotides par H. Köster (Tetr. Let., 1527-1530, 1970). Ce support était mis en oeuvre dans le cadre de la méthode au phosphodiester.

25 Récemment, des supports inorganiques ont été utilisés par Caruthers et al. pour construire des chaînes oligonucléotides en utilisant la méthode au phosphite qui utilise une phosphorylation à - 78°C (M.D. Matteucci et al. Tetr. Let., 21, 719-722, (1980)).

30 De façon générale, on peut dire que si les supports inorganiques présentent de nombreux avantages par rapport aux supports organiques, ils présentent

a été modifiée pour créer des groupes NH_2 sur la silice par le procédé décrit de façon générale par P. Tundo et al. (J. Am. Chem. Soc., 101, 22, October 24, 1979).

5 Pour obtenir le support selon la présente invention, on fait réagir la silice Porasil avec un aminoalkyle-trialcoxysilane, à reflux dans un solvant.

10 Il est ensuite nécessaire de bloquer les groupes Si-OH restant sur la silice, ce qui peut être effectué par traitement du produit obtenu avec du chlorure de triméthylsilyle, par exemple en solution pyridinique. Ce traitement permet un blocage efficace des groupes silanol restants et le support ainsi obtenu peut être utilisé dans la synthèse des poly-nucléotides.

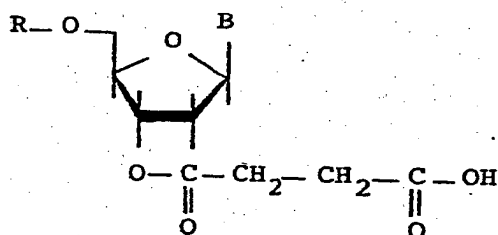
15 Afin de faciliter la compréhension des expériences qui vont suivre, on donnera ci-après un schéma de la préparation du support solide sur lequel on a fixé le premier nucléoside.

20

25

Sur ce schéma, on a représenté schématiquement la résine Porasil par ses groupes silanols situés en surface. C'est sur ces groupes silanols que l'on fait réagir la triéthoxysilylpropylamine afin d'obtenir le support selon la présente invention.

Dans un deuxième temps on prépare le déoxynucléoside activé, comme cela est décrit en particulier dans Itakura et al. (Nucl. Ac. Res., 8, 22, 5473, 1980). Les 5'-diméthoxy N-acyl déoxynucléosides sont traités avec l'anhydride succinique en présence de N,N-diméthylaminopyridine en solution dans le diméthylformamide. Le succinate de déoxynucléoside résultant a la formule suivante :

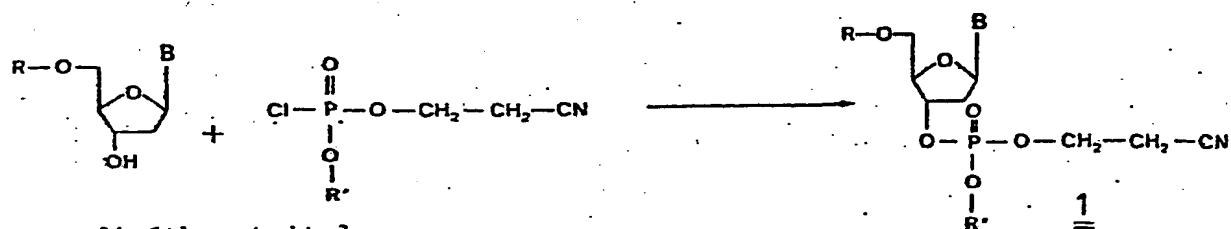


dans laquelle R est le radical trityle, monométhoxytrityle et diméthoxytrityle et B est N-acyle adénine, guanine, cytosine ou thymine.

Le succinate ainsi obtenu est condensé avec le pentachlorophénol en utilisant le DCC à titre d'agent de condensation.

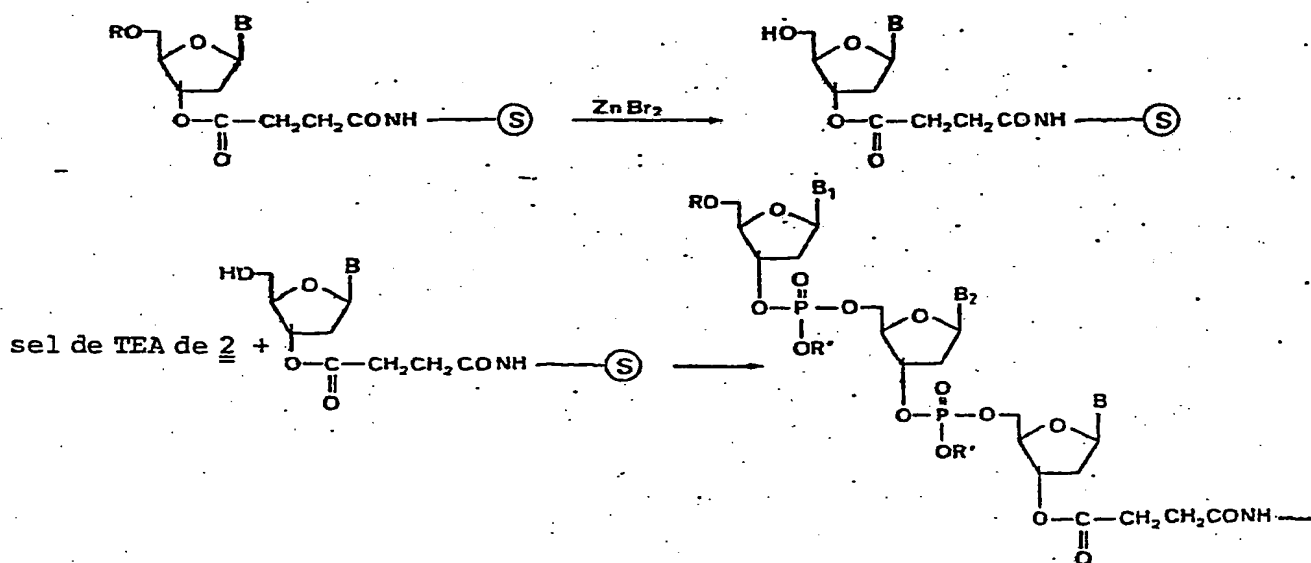
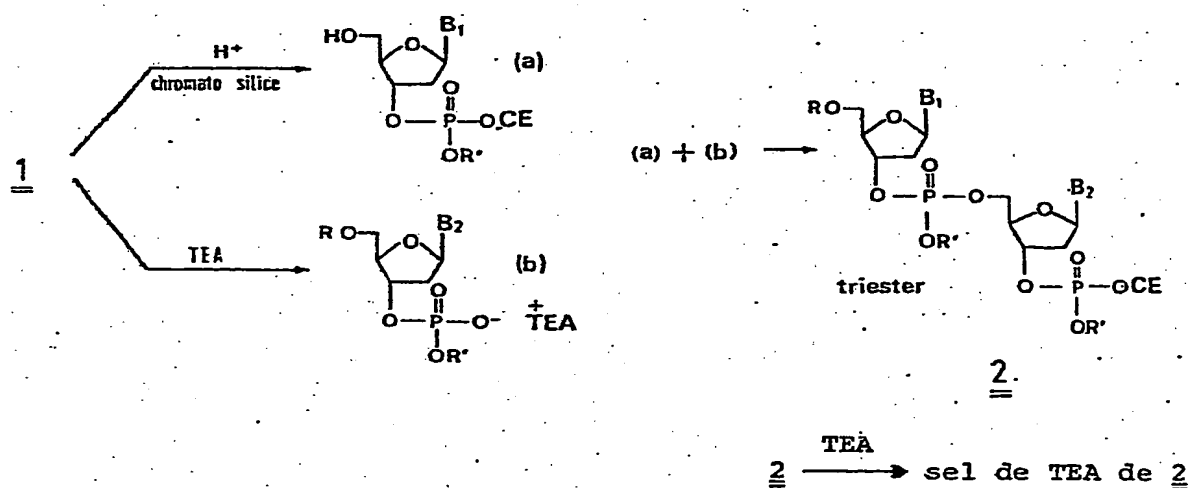
Cet ester de pentachlorophénol peut être utilisé comme nucléoside activé.

Le nucléoside ainsi activé est traité avec le support préparé précédemment en solution dans le diméthylformamide en utilisant la triéthylamine comme catalyseur pendant 20 à 24 heures.



R = diméthoxytrityle

R' = o-chlorophényle



Exemple 1Préparation du support selon l'invention

On ajoute à 10 g de silice Porasil B 15 ml de triéthoxysilylpropylamine dans 50 ml de toluène et le mélange est porté au reflux pendant 7 heures. Le mélange est refroidi. La silice est filtrée et lavée avec deux fois 100 ml de pyridine.

On ajoute alors 11 ml de chlorure de triméthylsilyle et le mélange est agité pendant 4 heures à la température de la pièce. La silice est filtrée, lavée avec 3 fois 50 ml de pyridine et 3 fois 50 ml d'éther éthylique puis on sèche dans un dessiccateur pour obtenir une silice portant des groupes amines libres.

6 g de la silice ainsi modifiée sont traités avec 1 g de triéthylamine dans 10 ml de pyridine pendant 2 à 3 heures. L'excès de triéthylamine est éliminé par coévaporation avec la pyridine ou par filtration et lavage avec le dichlorométhane et l'éther éthylique.

La silice modifiée ainsi obtenue est séchée en dessiccateur et utilisée pour être chargée par le déoxynucléotide activé dont on va maintenant décrire la préparation.

Exemple 2Préparation du déoxynucléotide activé

- Synthèse du monosuccinate de 3'(5'-O-diméthoxytrityl) déoxynucléoside :

Il s'agit là d'un procédé général pour l'ensemble des nucléosides, c'est pourquoi on décrira uniquement la préparation du monosuccinate de 3'(5'-O-diméthoxytrityl) thymidine.

5,45 g de 5'-O-diméthoxytritylthymidine anhydre (10 mmoles) sont dissous dans 40 ml de pyridine contenant 1,83 g de diméthylaminopyridine (15 mmoles) et 1,50 g d'anhydride succinique (15 mmoles).

dans 30 ml de DMF est agité à la température de la pièce pendant 20 heures. Le mélange réactionnel est filtré et la résine est lavée avec du DMF et de la pyridine puis traité avec du phénylisocyanate (10 % en solution) dans la pyridine (35 ml) pendant 3 heures pour bloquer les fonctions amino libres.

Le mélange est filtré et la résine est lavée avec de la pyridine et du méthanol puis séchée. Le rendement est de 5,6 g.

La quantité estimée de thymidine fixée sur la résine est de 0,20 mmole par gramme évaluée par spectroscopie de la fonction diméthoxytrityle et par la quantité de thymidine libérée de la résine.

Un procédé de détermination quantitative de la charge du premier nucléoside sur le support selon la présente invention est effectué de la façon suivante :

1°) on pèse précisément 1 mg de support chargé sec.

2°) On ajoute 1 ml d'acide toluène sulfonique 0,1 M dans l'acétonitrile.

3°) On mesure l'absorbance à 498 nm. Si l'absorbance approche 2,0 alors on dilue et on effectue une nouvelle lecture. La charge peut être calculée de la façon suivante :

$$\text{Charge en } \mu\text{moles/g} = \frac{(\text{Abs } 498) (\text{facteur de dilution})}{\text{Poids silica gel (mg)}} \times 14,3$$

De cette façon on obtient pour première charge avec les supports selon la présente invention entre 200 et 215 $\mu\text{moles/g}$, ce qui est considérable par rapport à toutes les données existantes concernant les supports inorganiques, ces résultats étant voisins de ceux obtenus avec les supports organiques.

anhydre on ajoute une solution de 2 mmoles de β -cyano-éthyle phosphomonochloridate de O-chlorophényle dans 0,5 ml d'acétonitrile sous agitation pendant 5 minutes.

5 Le mélange réactionnel est trempé avec 2 ml d'un tampon phosphate pH 7. La phase organique est évaporée et le résidu est réparti entre 10 ml de chloroforme et 10 ml d'eau. La couche chloroformique est lavée avec une solution de dihydrogène-phosphate de sodium 0,1 M trois fois, puis deux fois avec de l'eau.

10 Le dérivé déoxyguanosine correspondant nécessite l'addition d'une quantité supplémentaire de monochloridate. Ceci est dû à la phosphorylation de la position O⁶ de la guanine. Toutefois, la partie phosphoryle en position O⁶ peut être éliminée par
15 agitation du triester avec du silica gel 60 pendant une nuit dans une solution de dichlorométhane contenant quelques gouttes de pyridine pour éviter une détritilation. Le rendement global est de 60 à 70 % de triester pur après chromatographie sur une petite colonne.

20 Pour obtenir les phosphates de 5'-diméthoxytrityle N-acyle déoxynucléoside 3'-O-chlorophényle triéthylammonium, les triesters mentionnés précédemment sont traités avec la triéthylamine dans une solution pyridine-acétonitrile pendant 1 heure. Le procédé est
25 décrit par Gait M.J., Sheppard R.C., Nuc. Ac. Res. (1977) 4, 1135-1158.

Les sels correspondants sont obtenus par précipitation dans l'éther de pétrole (40-60°C).

30 Pour la synthèse par étape des déoxypolynucléotides on utilise soit les sels de triéthylammonium du mononucléotide ou les blocs de dinucléotides correspondants. Les blocs de dinucléotides sont préparés par le procédé ci-après.

pièce, le support solide est lavé avec de la pyridine. Pour bloquer les groupes hydroxyles n'ayant pas réagi, le solide est traité avec la solution de protection suivante pendant 25 minutes :

- 5 20 mmoles N,N-diméthylaminopyridine,
 10 mmoles d'anhydride acétique,
 50 ml de pyridine.

Ce réactif bloque les groupes hydroxyles n'ayant pas réagi.

- 10 Le solide est lavé avec du dichlorométhane. Les groupes 5'-diméthoxytrityle sont éliminés par traitement avec une solution saturée de bromure de zinc dans un mélange dichlorométhane-isopropanol, (7-3). Le support est alors lavé avec du dichlorométhane
15 et du DMF. Il est ensuite séché par passage de pyridine sèche à travers la colonne. Ce cycle, à savoir :

- a) condensation 1 heure,
b) lavage avec de la pyridine,
c) protection,
20 d) lavage,
e) détritylation,
f) trempage avec du DMF,
g) séchage avec de la pyridine,

- est répété pour les blocs de dinucléotide CA, AC, GC
25 et TG en utilisant 100 μ moles de chaque dimère et 1 mmole de MSNT dans 1 ml de pyridine anhydre. La déprotection finale du déoxyoligonucléotide à partir du support solide et l'élimination des différents groupes de protection ainsi que la purification par HPLC seront
30 décrites ci-après.

Conclusion générale

La méthode décrite ici est donc l'application de la synthèse triester des oligonucléotides sur un support inorganique du type silice.

5 Cette procédure a été employée avec succès pour la production en routine d'oligonucléotides dont différents exemples ont été donnés.

Les principaux avantages de cette procédure sont :

10 1) L'utilisation d'intermédiaires stables qui peuvent être préparés en grande quantité et stockés. Ces intermédiaires, utilisés en excès, peuvent être récupérés après synthèse et réutilisés après repurification.

15 2) L'utilisation d'un support inorganique, non soluble, possédant de bonnes qualités mécaniques et autorisant une charge élevée en premier nucléoside. Un tel support est compatible avec la technique phosphotriester :

- 20 - détritylation avec le bromure de zinc, réactif de choix qui ne peut pas être utilisé sur support inorganique de type poly-acrylamide (GAIT) ;
- 25 - activation des sels de triéthylammonium par le MSNT dans un solvant polaire (pyridine) ;
- utilisation de l'anhydride acétique pour protéger les 5' hydroxyles restés libres.

8) Procédé selon l'une des revendications 6 et 7, caractérisé en ce qu'après le traitement avec le dérivé de silane le produit obtenu est traité par le chlorure de triméthylsilyle.

- 5 9) Application du support selon l'une des revendications 1 à 5 dans la synthèse au phosphotriester des polynucléotides.

THIS PAGE BLANK (USPTO)